

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX SYSTEMES DE GUIDAGE ET DE VECTORISATION DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE VERS DES CELLULES CIBLES.

5 La présente invention concerne la synthèse et la caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique vers des cellules cibles.

10 Plus précisément, l'invention s'intéresse à des complexes moléculaires capables de combiner plusieurs molécules fonctionnelles, possédant des propriétés prédéfinies de reconnaissances ou effectrices, à leur procédé de préparation et à leur utilisation thérapeutique ou comme outils de diagnostic.

15 La littérature décrit de nombreux procédés d'obtention de complexes bio-conjugués polyfonctionnels monovalents (Lemieux et al. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16, 506-513). Toutefois, ces complexes suscitent une réponse biologique relativement faible. Des systèmes
20 multivalents ont alors été préparés (Tam et al., *Biomedical Peptides, Proteins & Nucleic Acids*, 1995, 1, 123-132). Des études ont démontré que les complexes polyvalents étaient, de manière générale, de bien meilleurs outils biologiques que les complexes bio-conjugués monovalents (Grubbs, R.H.
25 et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 1275-1279).

 L'intérêt de tels complexes bio-conjugués est d'associer les propriétés propres d'au moins deux classes de molécules différentes. Toutefois, une des difficultés qui se présente est l'interaction potentielle que peuvent
30 présenter les différentes molécules d'un bio-conjugué. Cette interaction peut modifier les propriétés résultant de la bio-conjugaison. Une solution à ce problème consiste à séparer spatialement les points de bio-conjugaison, ce qui

a conduit au développement de gabarit ou de châssis moléculaires adressables. L. Scheibler, P. Dumy et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3725-3734, décrit la synthèse et la caractérisation de châssis moléculaires fonctionnalisés avec des groupes de coordination et des chaînes alcanes.

Une autre difficulté est la fixation sur le châssis des molécules d'intérêt. L. Scheibler, P. Dumy et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38, 696-699, décrit un châssis fonctionnalisé chimiosélectivement sur une face au moyen d'une liaison oxime.

Les enseignements de l'état de la technique ne permettent toutefois pas de synthétiser un châssis fonctionnalisé sur les deux faces, une au moins des fonctionnalisations étant chimiosélective, chaque face portant des molécules d'intérêt thérapeutique ou de diagnostic ou de marquage.

L'invention a donc pour objet un procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé sur ses deux faces.

Plus précisément, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé formant un châssis définissant deux faces, une face dite supérieure et une face dite inférieure, lesdites deux faces étant toutes les deux greffées, caractérisé en ce que l'on synthétise un peptide linéaire, ladite synthèse étant effectuée à partir d'acides aminés modifiés ou non, certains d'entre eux portant des groupes protecteurs orthogonaux, on effectue une cyclisation intramoléculaire du peptide linéaire obtenu, on substitue tout ou partie des groupes protecteurs orthogonaux par un précurseur protégé, on greffe sur l'une et/ou l'autre face dudit châssis, par une liaison oxime, au moins une molécule d'intérêt.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation du châssis moléculaire d'une molécule polyfonctionnelle, obtenue en quatre étapes : (1) la synthèse d'un peptide linéaire ; (2) la cyclisation intramoléculaire de ce peptide linéaire de manière à obtenir un châssis moléculaire ; (3) la fonctionnalisation de ce châssis ; (4) le greffage d'au moins une molécule d'intérêt sur l'une et/ou l'autre face de ce châssis.

Les acides aminés utilisés pour la synthèse peptidique sont de toute nature, y compris les acides aminés de la série (D), les acides aminés de la série (L), ainsi que tout acide aminé modifié, les acides aminés étant naturels ou synthétiques. Certains de ces acides aminés sont substitués par des groupes protecteurs orthogonaux. Les groupes protecteurs orthogonaux sont des groupes chimiques orientés perpendiculairement par rapport au plan médian du châssis ; ils masquent la réactivité d'un atome ou d'un groupe d'atome et leur élimination chimique n'affecte pas les autres groupes protecteurs de nature différente présents au sein de la molécule. Leur choix dépend de la nature de l'acide aminé et du châssis désiré.

Suivant un premier mode de réalisation de l'invention, la synthèse du peptide linéaire, effectuée sur phase solide, est initiée à partir d'un résidu de glycine dont la fonction carboxylique est ancrée à une résine, et la cyclisation du peptide linéaire obtenu est effectuée en solution après libération de la résine. La stratégie d'élongation d'un tel peptide linéaire est décrite dans l'état de la technique (P. Dumy et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36, 1255-1258). L'initiation de la synthèse par un résidu de glycine permet d'éviter tout risque d'épimérisation durant l'étape suivante de cyclisation. De préférence, la glycine est reliée à la résine par sa

fonction carboxylique. Sa fonction alpha amine est protégée par un groupe protecteur permettant par synthèse l'élongation du peptide. À l'issue de la synthèse du peptide linéaire, la fonction alpha aminoterminal de
5 peptide est libérée du groupe protecteur au cours d'une première étape et la fonction carboxyterminale est libérée de la résine au cours d'une seconde étape de libération du peptide linéaire protégé, les chaînes latérales restant protégées par leur groupe protecteur orthogonal. Les
10 fonctions chimiques N- et C-terminales libérées du peptide linéaire solubilisé réagissent pour former une liaison peptidique intramoléculaire au cours d'une étape de cyclisation intramoléculaire effectuée en solution.

15 Suivant un second mode de réalisation, la synthèse du peptide linéaire puis sa cyclisation sont entièrement effectuées sur phase solide. Dans ce mode de réalisation, la synthèse du peptide linéaire est initiée par un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale est
20 ancrée à une résine, laissant sa fonction carboxylique libre d'ancrage. La fonction alpha amine et la fonction carboxylique de cet acide aminé sont protégées chacune par un groupe protecteur, les deux groupes protecteurs étant orthogonaux entre eux.

25 À l'issue de la synthèse du peptide linéaire, les fonctions alpha aminoterminal et carboxyterminale sont libérées sélectivement de leur groupe protecteur respectif et le peptide linéaire obtenu reste lié à la résine par la chaîne latérale du premier résidu d'acide aminé. Les
30 fonctions chimiques terminales du peptide linéaire obtenu sont alors libres pour pouvoir réagir entre elles et former un cycle intramoléculaire au cours d'une étape de cyclisation intramoléculaire effectuée sur phase solide.

Dans ce mode de réalisation, le procédé est avantageusement, entièrement ou partiellement automatisé sur robot synthétiseur de peptides.

Avantageusement, le cyclopeptide est formé de 5, 10 ou 14 résidus d'acides aminés, de préférence 10 acides aminés formant un cyclodécapeptide. Le cyclopeptide cyclisé selon l'invention présente au moins un coude, préférentiellement deux coudes. Certains cyclopeptides selon l'invention présentent une symétrie centrale.

Suivant un mode de réalisation préféré, le cyclopeptide présente 10 ou 14 résidus d'acides aminés et forme deux coudes, chaque coude étant formé par une combinaison (L)Pro-(D)AA ou (D)Pro-(L)AA, AA étant un acide aminé et de préférence la glycine, les deux coudes étant séparés par trois et/ou cinq résidus d'acides aminés.

La présence du résidu proline au niveau du coude est justifiée par le fait que la proline montre une configuration spatiale caractéristique, en comparaison des autres acides aminés, du fait de sa structure cyclique. Cette caractéristique confère une restriction conformationnelle au squelette peptidique en comparaison à celle adoptée avec des acides aminés autre que la proline ou ses dérivés. Cette restriction est, notamment, à l'origine des coudes dans les structures polypeptidiques secondaires et supersecondaires.

L'autre résidu d'acide aminé du coude, ci-dessus représenté par le sigle AA, est préférentiellement un résidu d'acide aminé autre que celui de la proline et de stéréochimie opposée et très préférentiellement le résidu glycine.

Les coudes sont séparés par des résidus d'acides aminés, préférentiellement un nombre impair de résidu d'acides aminés et très préférentiellement trois

et/ou cinq acides aminés pour un cyclodécapeptide et un cyclotérapeptide respectivement.

Les cyclopeptides à deux coudes et ayant un nombre pair de résidus d'acides aminés présentent un plan médian qui définit une face dite supérieure et une face dite inférieure.

De préférence, les trois et/ou cinq résidus d'acides aminés ont chacun une fonction chimique protégée orthogonalement par un groupe protecteur. Les groupes protecteurs des chaînes latérales de ces acides aminés se dirigent alternativement de part et d'autre du plan médian dudit châssis et définissent une face dite inférieure et supérieure par rapport à ce plan.

Ces résidus d'acides aminés sont préférentiellement des résidus d'acides aminés portant des fonctions chimiques du type $-NH_2$, $-SH$ ou $-COOH$. Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, ces trois ou cinq résidus d'acides aminés sont préférentiellement des acides aminés à chaîne latérale amine, et très préférentiellement, la lysine.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, les groupes protecteurs orthogonaux des résidus d'acides aminés centraux sont identiques entre eux, les groupes protecteurs orthogonaux des résidus d'acides aminés autres que centraux sont identiques entre eux, les groupes protecteurs orthogonaux des résidus d'acides aminés centraux, d'une part, et les groupes protecteurs orthogonaux des autres résidus d'acides aminés, d'autre part, sont différents les uns des autres.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, on débute le greffage du châssis en substituant des groupes protecteurs orthogonaux du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine ou un

précurseur masqué de la fonction aldéhyde, en particulier du type α -oxoaldéhyde, ou par un précurseur protégé de la fonction thiol ou par un marqueur. Suivant une première variante de l'invention, le précurseur protégé de la fonction thiol est un dérivé disulfure dissymétrique de la cystéine et en particulier un groupé Npys (figure 1b)

Suivant une autre variante de l'invention, ce précurseur protégé est l'acide 2-oxyamino-acétique protégé (AOA) sur l'azote ou encore un dérivé de la sérine, précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde, dont les fonctions amine et hydroxyle sont protégées, et dont la déprotection puis le clivage oxydatif libère le groupement aldéhyde, et de préférence est Boc-Ser(tBu)OH.

Suivant un premier mode de réalisation, l'on effectue en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure par un marqueur, de préférence la biotine ou la fluorescéine, puis dans une deuxième étape, on substitue les groupes protecteurs orthogonaux de la face supérieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine ou de la fonction α -oxoaldéhyde. On fait réagir ensuite la fonction oxyamine ou α -oxoaldéhyde du précurseur, préalablement déprotégé, avec une molécule d'intérêt ou une molécule intermédiaire portant une fonction respectivement α -oxoaldéhyde ou oxyamine. Dans ce mode de réalisation, la substitution de la face inférieure est classique, tandis que la substitution de la face supérieure est chimiosélective.

Suivant un second mode de réalisation, l'on effectue en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine puis dans

une deuxième étape on substitue les groupes protecteurs orthogonaux de la face supérieure du cyclopeptide par un précurseur protégé de la fonction α -oxoaldéhyde.

Suivant un troisième mode de réalisation de l'invention l'on effectue en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face supérieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine puis dans une deuxième étape on substitue les groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure du cyclopeptide par un précurseur protégé de la fonction α -oxoaldéhyde.

Suivant un quatrième mode de réalisation de l'invention, on effectue la substitution des groupes protecteurs orthogonaux d'une face du châssis par un précurseur protégé de la fonction aldéhyde ou oxyamine puis la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de l'autre face du châssis par un précurseur protégé de la fonction thiol. On effectue ensuite le greffage des molécules d'intérêt en faisant réagir des groupes fonctionnels complémentaires. Dans ce mode de réalisation, on effectue en premier lieu le greffage des molécules d'intérêt portant un précurseur aldéhyde ou oxyamine sur la face du châssis portant un précurseur oxyamine ou aldéhyde respectivement puis on fait réagir l'autre face du châssis sous sa forme thiol libre ou sous forme de disulfure dissymétrique activé avec une seconde molécule d'intérêt portant une fonction disulfure dissymétrique activé ou thiol libre respectivement. Cette seconde molécule est alors attachée sur le châssis via une agrafe disulfure. Les molécules d'intérêt peuvent être un peptide, une protéine, un oligosaccharide, un acide nucléique, une molécule organique, une molécule inorganique (Figures 1b et 2b). Avantageusement cette agrafe peut permettre le relargage

intra-cellulaire de la molécule d'intérêt afin qu'elle puisse jouer son rôle biologique.

Dans les modes de réalisation ci-dessus, l'on fait réagir les fonctions actives, notamment oxyamine ou α -oxoaldéhyde des précurseurs, préalablement déprotégées, avec une ou plusieurs molécules d'intérêt ou une molécule intermédiaire portant une fonction complémentaire, dans notre exemple respectivement α -oxoaldéhyde ou oxyamine. De préférence, l'on fait réagir la fonction oxyamine du précurseur située sur le châssis avec une molécule d'intérêt portant une fonction α -oxoaldéhyde, puis on oxyde le précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde situé sur le châssis et l'on poursuit la réaction avec une mise en contact du châssis avec au moins une molécule d'intérêt ou une molécule intermédiaire portant une fonction oxyamine.

La ou les molécules intermédiaires portent d'une part une fonction oxyamine capable de réagir avec la ou les fonctions α -oxoaldéhydes situées sur le châssis, et portent d'autre part un précurseur d'au moins une fonction α -oxoaldéhyde.

La ou les molécules d'intérêt sont identiques ou différentes les unes des autres.

Avantageusement, la molécule d'intérêt est un acide nucléique, un peptide, un oligosaccharide, ou une molécule organique. Toute molécule d'intérêt thérapeutique ou de diagnostic portant une fonction oxyamine ou α -oxoaldéhyde peut être greffée sur le châssis.

Suivant une première variante de l'invention, on greffe sur une face du châssis avec des peptides dérivés du cyclo(RGDfK) et du cyclo(RGDyK) ligands de l'intégrine $\alpha V \beta 3$, afin de diriger la molécule vers les tissus exprimant

ce récepteur et de modifier des effets biologiques dans un but thérapeutique ou de diagnostic.

5 ♦ Si le but est thérapeutique, on greffe l'autre face du châssis selon l'invention avec un peptide apoptogène du type (KLAKKLAK), ou une molécule organique connue du type (doxorubicine) ou une protéine toxique intracellulairement (ricin-A, galénine...)

10 ♦ Si le but est de diagnostic in vitro et in vivo on greffe l'autre face du châssis avec un ou des chromophore(s), une ou des biotine(s) ; un ou des fluorophore(s), une ou des radio-émetteur(s) ou un groupe précurseur (chimique ou ligand)

15 Suivant une seconde variante de l'invention, on greffe une face du châssis avec des dérivés carbohydrates pour le ciblage de leur récepteur transmembranaire de type lectine notamment récepteur à mannose, récepteur à galactose, 20 récepteur asialo-protéine, récepteur transporteur du glucose GLUT... dans un but thérapeutique ou de diagnostic.

25 ♦ Si le but est thérapeutique, on greffe l'autre face du châssis selon l'invention avec un ou des peptides(s) épitope(s) T-dépendant, avec un ou des peptides apoptogènes du type (KLAKKLAK), ou une molécule organique connue du type (doxorubicine) ou une protéine toxique intracellulairement (ricin-A, galénine...)

30 ♦ Si le but est de diagnostic in vitro et in vivo on greffe l'autre face du châssis avec un ou des chromophore(s), une ou des biotine(s) ; un ou des fluorophore(s), une ou des radio-

émetteur(s) ou un groupe précurseur (chimique ou ligand)

5 Suivant une troisième variante de l'invention, on greffe une face du châssis avec des épitopes B-dépendant de type peptide ou carbohydrate plus particulièrement marqueur de tumeur (Tn, sTn, Tf), un ou des épitopes T-dépendants (peptides Th1 ou Th2) et un immunoadjuvant afin de susciter la réponse cellulaire dans une but de vaccination.

10

Suivant une quatrième variante de l'invention, on fonctionnalise les surfaces dans le but de leur conférer des propriétés de reconnaissance utile dans les systèmes miniaturisés de type bio-puce.

15

Avantageusement, le procédé selon l'invention, lorsque la synthèse et la cyclisation sont réalisées en phases solides, est entièrement ou partiellement automatisé sur robot synthétiseur de peptide.

20

L'invention a également pour objet un cyclopeptide homodétique greffé caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé selon l'invention.

Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou de diagnostic caractérisée en ce qu'elle comprend un cyclopeptide homodétique greffé obtenu par le procédé selon l'invention.

25

L'invention concerne également l'utilisation d'un cyclopeptide homodétique greffé obtenu par le procédé selon l'invention ou d'une composition le contenant, pour la fabrication d'un médicament destiné à soigner le cancer. L'invention concerne également l'utilisation d'un cyclopeptide homodétique greffé obtenu par le procédé selon

30

l'invention ou d'une composition le contenant, comme outil de diagnostic du cancer.

L'invention concerne également l'utilisation d'un cyclopeptide homodétique greffé obtenu par le procédé selon l'invention ou d'une composition le contenant, pour le diagnostic et/ou la suppression de la néoangiogénèse.

L'invention concerne également l'utilisation d'un cyclopeptide homodétique greffé obtenu par le procédé selon l'invention ou d'une composition le contenant, de châssis pour fonctionnaliser des surfaces dans le but de leur conférer des propriétés de reconnaissance utile dans les systèmes miniaturisés de type bio-puce.

L'utilisation de surface comme interface fonctionnelle douée de propriétés de reconnaissance représente une stratégie de choix pour la conception de ces systèmes qui est transférable avec une large gamme de technologie permettant leur miniaturisation micro- ou nanométrique ainsi que leur connectique.

D'une part, la fonctionnalisation de la surface hôte par un des partenaires impliqué dans la reconnaissance (sonde : molécules, biomolécules, cellules) est une étape clé pour réaliser cette interaction moléculaire à l'interface de la surface et de l'analyte. Cet adressage doit être suffisamment doux pour préserver l'intégrité et les propriétés moléculaires de la sonde, reproductible pour être exploitable et spatialement contrôlé pour permettre la détection de différentes cibles en parallèle. D'autre part, la fonctionnalisation peut conduire également à la transduction de la reconnaissance sonde-cible en un signal mesurable et quantifiable permettant la détection de la cible. L'intérêt majeur de cette stratégie réside dans l'absence de marquage de la cible qui permet la généralisation de l'approche à toutes catégories de cibles.

Dans ce cadre le procédé de l'invention permet d'utiliser une face du châssis pour l'adressage de la surface par exemple en utilisant des greffons thiols ou par électropolymérisation en utilisant des pendants de type pyrrole. L'autre face est utilisée selon le procédé de l'invention pour le greffage de molécule d'intérêt sur la surface. Avantageusement, l'utilisation de précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde protégé par une groupe photolabile du type NVOC permet l'adressage spatialement contrôlé de la surface par une molécule d'intérêt. Le procédé de l'invention est largement plus avantageux pour la fonctionnalisation de surface que les méthodes classiquement utilisées.

D'autres modes de réalisation du châssis et de son greffage selon l'invention sont représentés dans la description détaillée ci-dessous, qui se lit en regard des figures et illustre non limitativement l'invention.

La figure 1a illustre le schéma de préparation de cyclodécapeptides selon l'invention comportant, d'une part sur la face supérieure la sérine précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde et sur la face inférieure la fonction oxyamine, et d'autre part sur la face supérieure la fonction oxyamine et sur la face inférieure la sérine précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde.

La figure 1b illustre le schéma de préparation de cyclodécapeptides selon l'invention comportant, sur la face supérieure, soit la sérine précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde soit la fonction α -oxoaldéhyde, et d'autre part sur la face inférieure la fonction C-Npys.

Les figures 2a et 2b illustrent le schéma de préparation de macromolécules polyfonctionnelles par assemblage chimiosélectif successif des biomolécules R1 et

R2 par lien oxime, d'une part sur la face inférieure puis supérieure du cyclodécapeptide, et d'autre part sur la face supérieure puis inférieure du cyclodécapeptide.

La figure 3 illustre le schéma de synthèse de macromolécules polyfonctionnelles par assemblage chimiosélectif successif par lien oxime, où la biomolécule R1 est greffée sur une face du cyclodécapeptide, où quatre molécules comportant une fonction oxyamine et au moins une sérine précurseur de la fonction α -oxoaldéhyde est greffée sur l'autre face du cyclodécapeptide, et finalement où la biomolécule R2 est greffée après démasquage des fonctions α -oxoaldéhydes.

La figure 4 illustre le schéma de synthèse de macromolécules polyfonctionnelles par assemblage chimiosélectif successif par lien oxime, où la biomolécule R1 est greffée sur une face du cyclodécapeptide, où quatre molécules comportant une fonction oxyamine et quatre sérine précurseurs de la fonction α -oxoaldéhyde est greffée sur l'autre face du cyclodécapeptide, et finalement où la biomolécule R2 est greffée après démasquage des fonctions α -oxoaldéhydes.

La figure 5 représente la récupération du signal de la fluorescence du récepteur $\alpha V \beta 3$ après immunomarquage (anticorps LM609-R-Phycoerythrine) en fonction du temps pour les différentes conditions d'incubation des cellules vivantes HEK (expérience de FRAP). Le retard observé avec le composé multivalent RGD (carrés pleins) traduit une diminution de la mobilité des récepteurs $\alpha V \beta 3$ caractéristique du phénomène de clustering non observé dans les autres conditions.

La figure 6 représente les histogrammes de fluorescence obtenus par FACS après incubation des cellules (HEK) avec le composé multivalent RGD-fluoresceine.

La figure 7 compare les cinétiques de captation par les cellules cancéreuse PC3 du composé multivalent RGD assemblé selon l'invention (RAFT[cycloRGD]₄ : losanges) à celles des molécules contrôles par mesure de l'activité radioactive de l'iode 125.

Selon le premier mode de réalisation illustré sur la figure 1a, on effectue en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux PG de la face inférieure soit PG2 et PG5, par un précurseur protégé de la fonction α -oxoaldéhyde, et de préférence Boc-Ser(tBu)OH ; dans une deuxième étape, on substitue les groupes protecteurs orthogonaux de la face supérieure du châssis, PG1, PG3, PG4, PG6 par un précurseur protégé de la fonction oxyamine, et de préférence Boc-AOA-OSu; dans une troisième étape représentée sur la figure 2a, on enlève tous les groupes protecteurs, la fonction oxyamine sur la face inférieure ainsi déprotégée va réagir en présence d'une première molécule d'intérêt portant une fonction α -oxoaldéhyde ; dans une quatrième étape représentée sur la figure 2a, on oxyde les résidus séryles, en fonction α -oxoaldéhyde sur la face supérieure ; dans une cinquième étape, on fait réagir les fonctions α -oxoaldéhydes de la face supérieure avec une seconde molécule d'intérêt portant une fonction oxyamine.

Selon le second mode de réalisation représenté sur les figures 1a et 2a, on inverse l'ordre de substitution des groupes protecteurs orthogonaux et greffage des faces supérieure et inférieure par rapport au mode premier respectivement. Suivant un mode de réalisation

particulier de l'invention présenté figure 3, la dernière molécule d'intérêt greffée sur le châssis via sa fonction oxyamine permettant son greffage sur la ou les fonctions α -oxoaldéhydes situées sur le châssis, porte au moins un

5 précurseur d'une fonction α -oxoaldéhyde qui permet de poursuivre le procédé selon l'invention en oxydant ce précurseur en α -oxoaldéhyde et en faisant réagir cette dernière avec une molécule d'intérêt présentant une fonction oxyamine, de manière à créer un lien oxime

10 supplémentaire. Cette étape complémentaire permet la construction de système modulaire via couplage oxime itératif sur le châssis par démasquage de fonction α -oxoaldéhyde par oxydation successive.

Comme le décrit la figure 4, ce mode

15 particulier permet avantageusement d'amplifier le nombre de molécules présentées in situ par le châssis dans le cas de molécule d'intérêt qui, greffée sur le châssis via sa fonction oxyamine permettant son greffage sur la ou les fonctions α -oxoaldéhydes situées sur le châssis, porte plus

20 d'un précurseur d'une fonction α -oxoaldéhyde.

Exemple 1 : cyclopeptide selon l'invention formant un châssis greffé sur une face avec des peptides dérivés du cyclo(RGDfK) et/ou du cyclo(RGDyK), qui sont

25 ligands de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$,

Les peptides cyclo(RGDfK) reconnaissent l'intégrine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. Cette intégrine est sur-exprimée à la surface cellulaire de tumeurs ou de cellules endothéliales lors de la néoangiogénèse tumorale. Le greffage de ce

30 peptide sur une face du châssis selon l'invention, exalte les propriétés de reconnaissance de ce peptide par cette intégrine. De plus, les effets biologiques de cette intégrine, comme par exemple le clustering, et l'endocytose de la molécule, sont déclenchés par le châssis selon

l'invention ainsi greffé, alors qu'ils ne sont pas déclenchés par le peptide seul.

1) **Support pour la culture de cellules in vitro** : Les châssis comportant un groupe biotine sur une de leur face permettent d'une manière générale la fonctionnalisation de cette face par de la streptavidine grâce à l'interaction forte biotine-streptavidine. L'autre face du châssis peut être fonctionnalisée par une molécule d'intérêt ou libre.

L'utilisation de châssis comprenant par exemple des ligands d'adhésion comme le cyclo(RGDFK) permet la fixation de cellules exprimant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ et leur culture *in vitro*. A basse densité de molécules adsorbées sur la surface, les composés se révèlent particulièrement efficaces.

2) **Induction d'un regroupement (clustering) de récepteurs cellulaires (figure 5)** : le regroupement des intégrines en surface des cellules HEK293 surexprimant l'intégrine β_3 a été démontré par des expériences de FRAP. Les cellules vivantes sont mises en contact avec un anticorps anti $\alpha_v\beta_3$ marqué à la Phycoerythrine (LM609-PE) et avec les différents peptides. Une zone de la surface cellulaire est alors photo-blanchie afin de pouvoir mesurer la cinétique de réapparition du signal fluorescent dans cette zone. Cette mesure reflète la vitesse de migration de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ au sein de la membrane plasmique d'une cellule vivante. Si plusieurs molécules d'intégrines sont pontées par le peptide, alors le « cluster » ainsi formé migrera moins vite que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ native, plus petite et plus libre. Les résultats présentés dans la figure 5 démontrent que seul le peptide

obtenu selon l'invention est capable d'induire un tel regroupement d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules.

3) Internalisation active des drogues ou produits vectorisés : Les mêmes cellules mise en contact à 37 ou à 4°C pendant 15 à 30 minutes avec les peptides préalablement marqués à la fluoresceine sont observées en microscopie confocale après immunomarquage des vésicules d'endosomes précoces (marquage anti-Early Endosome 1A, visualisé en rouge).

Les résultats obtenus démontrent que seul le peptide obtenu selon l'invention est visualisable à 37°C en surface, aux jonctions intercellulaires et à l'intérieur des cellules. Une partie importante du signal intracellulaire est co-localisée avec le marquage EE1A ce qui démontre qu'une partie au moins du peptide RAFT-RGD est internalisé par endocytose. Les peptides cRGD et RAFT-RGD incubés dans les mêmes conditions ne sont pas détectables par immunofluorescence. Ceci démontre leur incapacité à se fixer aussi efficacement que le composé obtenu selon l'invention sur leur intégrine cible. Si l'incubation des peptides est réalisée à 4°C, seul le marquage extracellulaire est observé avec le peptide obtenu selon l'invention, confirmant que l'internalisation a lieu grâce à un processus actif.

4) Vecteur ciblant pour le transfert de biomolécules (ADN, peptides, protéines, PNA, oligonucléotides, siRNA) :

Seules les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont reconnues par le peptide obtenu selon l'invention. L'incubation de cellules HEK293 surexprimant soit l'intégrine β_1 soit β_3 avec le peptide fluorescent obtenu selon l'invention démontre que le peptide se fixe

uniquement sur les cellules surexprimant l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$. Cette propriété peut être utilisée selon l'invention pour le transport de molécules d'intérêt vers un récepteur cible.

- 5 5) **Tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$** : Le peptide fluorescent obtenu selon l'invention injecté par voie intraveineuse chez une souris porteuse de tumeurs révèle à l'imagerie médicale que ce peptide est retrouvé
10 fortement accumulé dans les zones hypervascularisées de la tumeur.

6) **Vaisseaux sanguins**

Nos résultats obtenus avec les peptides fluorescents obtenus selon l'invention démontrent que l'endothélium peut être reconnu par ces molécules injectées
15 par voie intraveineuse. D'autres tissus et notamment la capsule hépatique, les vaisseaux du foie et la rate ont aussi été imagés grâce à ces molécules. Le greffage d'autres ligands devrait permettre d'augmenter le signal obtenu sur l'endothélium.

- 20 7) **Activités enzymatiques en médecine ou in vitro sur culture de cellules (activité protéasiques notamment)**

Selon l'invention, il est possible de greffer sur le châssis des peptides contenant une séquence
25 spécifiquement reconnue par une protéase. Si l'on greffe une molécule fluorescente en amont du site de clivage et une molécule qui absorbe la fluorescence en aval de ce site, la faible distance entre les 2 marqueurs empêche toute émission de fluorescence. Par contre, en présence de
30 la protéase spécifique, les 2 fluorophores sont dissociés, et il y a donc émission de lumière quantifiable. Cette mesure permet de déterminer la concentration en protéase présente dans le compartiment, tissu ou cellule observé.

L'invention permet de diriger vers des tissus cibles ce système afin d'imager spécifiquement ces régions.

8) **Radiodétection des tissus endotheliaux lors de la néoangiogénèse tumorale ou des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (figure 7)**

Le marquage par l'iode 127 radioactif permet la détection de la molécule et donc de sa liaison à l'intégrine à la surface cellulaire puis de son entrée dans le cytosol après endocytose. L'effet de captation est dose dépendant en composés. Cet effet a été mesuré sur des cellules tumorales (PC-3) et endothéliales (HMVEC) exprimant l'intégrine. Ici encore seuls les cyclopeptides greffés selon l'invention possèdent l'effet observé contrairement au ligand isolé. Cette propriété permet l'imagerie des zones de néoangiogénèse par mesure de l'activité radioactive.

Exemple 2 : cyclopeptide selon l'invention formant un châssis greffé sur une face avec des épitopes B-dépendant de type carbohydrate plus particulièrement marqueur de tumeur (Tn, sTn, Tf), un ou des épitopes T-dépendants (peptides Th1 ou Th2) et un immunoadjuvant.

Ces substituants sont choisis pour susciter une réponse cellulaire, dans un but de vaccination.

Les sucres sont connus pour être des éléments très importants dans de nombreuses pathologies notamment le cancer (marqueur de tumeur) ou les infections virales et bactériennes. Cependant ils sont faiblement immunogène ce qui limitent grandement leur utilisation dans des compositions vaccinales à visées thérapeutiques évidentes. De plus la reconnaissance de motifs sucres passent par une présentation sous forme de grappes et est également une limite à leur utilisation. L'invention permet la présentation de motifs sucre sous forme de grappes et également leur manipulation chimique pour réaliser des

combinaisons épitopiques permettant à terme de susciter un apprentissage du système immunitaire pour protéger l'organisme des pathologies et infections impliquant ces motifs.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé formant un châssis définissant deux
5 faces, une face dite supérieure et une face dite inférieure, lesdites deux faces étant toutes les deux greffées, caractérisé en ce que l'on synthétise un peptide linéaire, ladite synthèse étant effectuée à partir d'acides aminés modifiés ou non, certains d'entre eux portant des
10 groupes protecteurs orthogonaux, on effectue une cyclisation intramoléculaire du peptide protégé linéaire obtenu, on substitue tout ou partie des groupes protecteurs orthogonaux par un précurseur protégé, on greffe sur l'une et/ou l'autre face dudit châssis, par une liaison oxime, au
15 moins une molécule d'intérêt.

2. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite synthèse du peptide linéaire, effectuée sur
20 phase solide, est initiée à partir d'un résidu de glycine dont la fonction carboxylique est ancrée à une résine, et la cyclisation du peptide linéaire obtenu est effectuée en solution après libération de la résine.

25 3. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite synthèse du peptide linéaire puis sa cyclisation sont entièrement effectuées sur phase solide.

30 4. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite synthèse du peptide linéaire est initiée par

un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale est ancrée à une résine.

5. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est entièrement ou partiellement automatisé sur robot synthétiseur de peptides.

10 6. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit cyclopeptide est formé de 5, 10 ou 14 résidus d'acides aminés, de préférence 10 acides aminés formant un
15 cyclodécapeptide.

7. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le cyclopeptide présente 10 ou 14
20 résidus d'acides aminés et forme deux coudes, lesdits deux coudes étant formés par une combinaison (L)Pro-(D)AA ou/et (D)Pro-(L)AA, AA étant un acide aminé et de préférence la glycine, les deux coudes étant séparés par trois ou cinq résidus d'acides aminés respectivement.

25

8. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que lesdits trois ou cinq résidus d'acides aminés ont chacun, sur leur chaîne
30 latérale, une fonction chimique initialement protégée orthogonalement par un groupe protecteur, les groupes protecteurs des chaînes latérales de ces acides aminés se dirigent alternativement de part et d'autre du plan médian

dudit châssis et définissent une face dite inférieure et supérieure par rapport à ce plan.

9. Procédé de préparation d'un cyclopeptide
5 homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce lesdits trois ou cinq résidus d'acides aminés sont préférentiellement des résidus aminoacides à chaîne latérale amine, et très préférentiellement la lysine.

10

10. Procédé de préparation d'un
cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que les groupes protecteurs orthogonaux desdits résidus d'acides aminés
15 centraux sont identiques entre eux, les groupes protecteurs orthogonaux desdits autres résidus d'acides aminés sont identiques entre eux, les groupes protecteurs orthogonaux desdits résidus d'acides aminés centraux d'une part, et les groupes protecteurs orthogonaux desdits autres résidus
20 d'acides aminés d'autre part, sont différents les uns des autres.

11. Procédé de préparation d'un
cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 1,
25 caractérisé en ce que l'on débute le greffage du châssis en substituant des groupes protecteurs orthogonaux par un précurseur protégé de la fonction oxyamine ou un précurseur masqué protégé de la fonction aldéhyde ou par un marqueur.

30

12. Procédé de préparation d'un
cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit précurseur protégé est l'acide 2-oxyamino-acétique protégé (AOA).

13. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit précurseur masqué protégé est
5 un résidu de la sérine dont les fonctions amine et hydroxyle sont protégées, et dont l'oxydation libère un groupement aldéhyde, et de préférence est Boc-Ser(tBu)OH.

14. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit précurseur protégé est
10 précurseur de la fonction thiol, de préférence un dérivé disulfure disymétrique de la cystéine et de manière très préférentielle un groupe Npys.

15 15. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que l'on effectue
20 en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure par un marqueur, de préférence la biotine ou la fluorescéine, puis dans une deuxième étape, on substitue les groupes protecteurs
orthogonaux de la face supérieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine ou de la
25 fonction aldéhyde.

16. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que l'on effectue
30 en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine puis dans une deuxième étape on substitue les groupes protecteurs

orthogonaux de la face supérieure du cyclopeptide par un précurseur masqué protégé de la fonction aldéhyde.

17. Procédé de préparation d'un
5 cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que l'on effectue en premier lieu la substitution des groupes protecteurs orthogonaux de la face supérieure du châssis par un précurseur protégé de la fonction oxyamine puis dans une
10 deuxième étape on substitue les groupes protecteurs orthogonaux de la face inférieure du cyclopeptidé par un précurseur masqué protégé de la fonction aldéhyde.

18. Procédé de préparation d'un
15 cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, caractérisé en ce que l'on fait réagir les fonctions oxyamine ou aldéhyde générées à partir des précurseurs, préalablement déprotégées, avec une ou plusieurs molécules d'intérêt ou une molécule intermédiaire
20 portant une fonction respectivement aldéhyde ou oxyamine.

19. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 18, caractérisé en ce que lesdites molécules d'intérêt sont identiques ou
25 différentes les unes des autres.

20. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que lesdites
30 molécules d'intérêts sont des acides nucléiques, des peptides, des oligosaccharides, ou des molécules organiques.

21. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'une au moins des molécules d'intérêt est le cyclopentapeptide c(RGDfK).

5

22. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que l'on fait réagir la fonction oxyamine du précurseur situé sur le châssis avec au moins une molécule d'intérêt portant une fonction aldéhyde, puis on oxyde le précurseur de la fonction aldéhyde situé sur le châssis et l'on poursuit la réaction avec une mise en contact du châssis avec une molécule d'intérêt ou une molécule intermédiaire portant une fonction oxyamine.

15

23. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, caractérisé en ce que ladite molécule intermédiaire porte d'une part une fonction oxyamine capable de réagir avec la ou les fonctions aldéhydes situées sur le châssis, et porte d'autre part un précurseur d'au moins une fonction aldéhyde.

20

24. Procédé de préparation d'un cyclopeptide homodétique greffé selon l'une quelconque des revendications 3 à 23, caractérisé en ce qu'il est entièrement ou partiellement automatisé sur robot synthétiseur de peptide.

25

30

25. Cyclopeptide homodétique greffé caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 24.

26. Cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est greffé sur une de ses faces par un ligand de l'intégrine $\alpha v \beta 3$, de
5 préférence des peptides dérivés du cyclo(RGDfK) et/ou du cyclo(RGDyK), qui sont ligands de l'intégrine, et sur l'autre de ses faces par un peptide apoptogène du type KLAKKLAK, une molécule organique thérapeutique connue du type doxorobucine, ou une protéine toxique au niveau
10 intracellulaire.

27. Cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est greffé sur une de ses faces par un ligand de l'intégrine $\alpha v \beta 3$, de
15 préférence des peptides dérivés du cyclo(RGDfK) et/ou du cyclo(RGDyK), qui sont ligands de l'intégrine, et sur l'autre de ses faces par une molécule détectable, du type chromophore(s), biotine(s), fluorophore(s), radio-émetteur(s) ou un précurseur.

28. Cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est greffé sur une de ses faces avec des dérivés carbohydrates et sur l'autre face avec un ou des peptides(s) épitope(s) T-
25 dépendant, un ou des peptides cytotoxiques, une ou des molécules organiques thérapeutiques ou une protéine toxique au niveau intracellulaire.

29. Cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est greffé sur une de ses faces avec des dérivés carbohydrates et sur l'autre face du châssis avec un ou des chromophore(s), une
30 ou des biotine(s) ; un ou des fluorophore(s), une ou des

radio-émetteur(s) ou un groupe précurseur chimique ou ligand.

30. Cyclopeptide homodétique greffé selon la
5 revendication 25, caractérisé en ce qu'il est greffé sur une face avec des épitopes B-dépendant de type carbohydrate ou des épitopes T-dépendants et un immunoadjuvant.

31. Composition thérapeutique ou de
10 diagnostic caractérisé en ce qu'elle comprend un cyclopeptide homodétique greffé selon la revendication 25.

32. Utilisation d'un cyclopeptide selon la
revendication 25 ou d'une composition selon la
15 revendication 31, pour la fabrication d'un médicament destiné à soigner le cancer.

33. Utilisation d'un cyclopeptide selon la
revendication 25 ou d'une composition selon la
20 revendication 31, pour la fabrication d'un outil de diagnostic du cancer.

34. Utilisation d'un cyclopeptide selon la
revendication 25 ou d'une composition selon la
25 revendication 31, pour le diagnostic de la néoangiogénèse.

35. Utilisation d'un cyclopeptide selon la
revendication 25 ou d'une composition selon la
revendication 31, pour la suppression de la néoangiogénèse.